

UFSC- UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA

CFM- CENTRO DE CIÊNCIAS FÍSICAS E MATEMÁTICAS

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

**DETERMINAÇÃO ESPECTROFOTOMÉTRICA DE ADRENALINA EM
PRODUTOS FARMACÊUTICOS**

ACADÊMICO: VALMES BERTECHINI JUNIOR

ORIENTADORA: Prof^a. Dr^a. IOLANDA DA CRUZ VIEIRA

FLORIANÓPOLIS, FEVEREIRO DE 2004

VALMES BERTECHINI JUNIOR

**DETERMINAÇÃO ESPECTROFOTOMÉTRICA DE ADRENALINA EM
PRODUTOS FARMACÊUTICOS**

Trabalho de conclusão de curso apresentado à
disciplina QMC 5231–Estágio Supervisionado, do
Curso de Graduação em Química, da Universidade
Federal de Santa Catarina, desenvolvido no
semestre 2003.2.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Iolanda da Cruz Vieira.

FLORIANÓPOLIS, FEVEREIRO DE 2004

Medicamento é um produto farmacêutico,
tecnicamente obtido ou elaborado com
alguma finalidade profilática, curativa,
paliativa ou para fins de diagnóstico.

(Lei 5991 de 17/12/1973).

ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS.....	i
LISTA DE TABELAS.....	ii
RESUMO.....	iii
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Importância dos Fármacos.....	2
1.2 Adrenalina.....	3
1.3 Métodos para Determinação de Adrenalina.....	4
2. OBJETIVOS.....	6
2.1 Objetivos Específicos.....	6
3. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL.....	7
3.1 Equipamento.....	7
3.2 Reagentes e soluções.....	7
3.3 Procedimento Analítico.....	8
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	9
4.1 Reagente de Biureto.....	9
4.2 Espectro de Absorção Molecular.....	11
4.3 Estudo da Concentração de Cu(II).....	12
4.4 Estudo do Tempo de Reação.....	13
4.5 Curva Analítica de Adrenalina.....	14

4.6 Determinação Espectrofotométrica de	
Adrenalina em Produto Farmacêutico.....	15
5. CONCLUSÕES.....	17
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	18

LISTA DE FIGURAS

• Figura 1- Estrutura da adrenalina.....	2
• Figura 2- Complexo formado na reação da adrenalina com o reagente biureto.....	9
• Figura 3- Espectro de absorção molecular do complexo formado na reação da adrenalina com o reagente biureto.....	10
• Figura 4- Curva analítica obtida para diferentes concentrações de Cu(II) e adrenalina $4,35 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$	12
• Figura 5- Estudo do tempo de reação usando diferentes concentrações de adrenalina e biureto.....	13
• Figura 6- Curva analítica da adrenalina.....	14

LISTA DE TABELAS

• Tabela 1- Estudo da concentração de Cu(II).....	11
• Tabela 2- Determinação de adrenalina em formulação farmacêutica utilizando o método espectrofotométrico proposto e e comparando com o valor rotulado.....	12

RESUMO

Uma metodologia, utilizando o reagente biureto, é proposta para determinação de adrenalina em produtos farmacêuticos. Esse procedimento foi desenvolvido a partir do complexo formado na reação de adrenalina e cobre (II) que absorve no comprimento de onda de 665 nm. A reação ocorre devido as ligações peptídicas que contém grupos carbamínicos, ligados diretamente ou por meio de um único átomo de carbono ou nitrogênio.

O estudo do efeito da concentração de Cu(II) presente no reagente de biureto em concentrações de $6,00 \times 10^{-3}$ a $1,077 \times 10^{-1} \text{ mol.L}^{-1}$, e o tempo de reação de 0 a 120 minutos sobre a resposta espectrofotométrica foram investigados. As melhores condições foram obtidas usando concentração de Cu(II) $0,0472 \text{ mol.L}^{-1}$ e tempo de reação de 5 min, respectivamente.

O procedimento proposto possui uma relação linear entre a absorbância medida e a concentração de adrenalina no intervalo de 0,1 a $0,7 \text{ mg.mL}^{-1}$. A determinação de adrenalina nos produtos farmacêuticos está em concordância com valor rotulado.

1. INTRODUÇÃO

Há cerca de quarenta anos, deparamo-nos com um interessante artigo, intitulado “Reflexões sobre a Química Analítica”, de C.J. Van Nieuwenburg da Universidade de Delft, Holanda, publicado no Bulletin de la Société Chimique de France, em que o autor assim inicia as suas considerações: “após ensinar química analítica durante mais de trinta e cinco anos, parece oportuno perguntar de que se cuida, na verdade, nessa disciplina, quais são os seus fundamentos, quais as características peculiares a esse ramo da química. Segundo uma definição, a química analítica trata de identificar e de dosar as substâncias químicas”.

“A meu ver”, diz Van Nieuwenburg, “a definição é demasiada, simplista e perigosa, errônea pelo menos sob dois pontos de vista. Em primeiro lugar, porque ignora a diferença bem nítida entre a química analítica e a análise química. Não se podem confundir esses dois conceitos”. “A química analítica é indiscutivelmente um ramo da química e por conseguinte uma ciência digna de ser ensinada no mais alto nível, ao passo que análise química é uma técnica, ou melhor, um conjunto de manipulações e de preceitos destinados a proporcionar o conhecimento da composição química de uma substância ou de uma mistura de substâncias. Essa distinção tem sido freqüentemente esquecida, levando por isso a subestimar o valor da química analítica como ciência”.

“A química analítica estuda os meios para determinar a composição de uma amostra natural ou artificial. Esse estudo nos proporciona um conjunto de técnicas que constituem a análise química”. “Portanto, a química analítica estuda e a análise química é um conjunto de técnicas resultante desse estudo”.

“A química analítica é um ramo da química, a ciência que persegue o objetivo de resolver os problemas de composição com operações de rotina”.¹

1.1 Importância dos Fármacos

Data de 1773 as iniciativas pioneiras de Antoine-François Foucroy, filho de um apotecário parisiense, que ainda durante a primeira fase da revolução francesa, incentivou a pesquisa química visando a farmácia e a medicina. Já buscava o homem, desde tempos imemoriais, na química da natureza, soluções para muitos dos seus males, mas apenas no fim do século 19, foi que Felix Hoffmann descobriu o ácido acetil salicílico (AAS), primeiro fármaco sintético, produzido e empregado para combater um dos maiores medos da humanidade, as dores. Esta molécula de apenas nove átomos de carbono, foi a pioneira dentre os fármacos sintéticos que predominam, largamente, no arsenal terapêutico moderno. Estima-se que 85% dos fármacos hoje utilizados, sejam sintéticos, e movimentou um mercado de cerca 380 bilhões de dólares, em 2002.²

1.2 Adrenalina

Adrenalina ou 3,4-dihidroxi- α -[(metilamino)metil]benzilálcool (Figura 1), também conhecida como epinefrina, é um pó cristalino, branco ou levemente amarelado, higroscópico com gradual escurecimento, inodoro e de sabor ligeiramente amargo³⁻⁵.

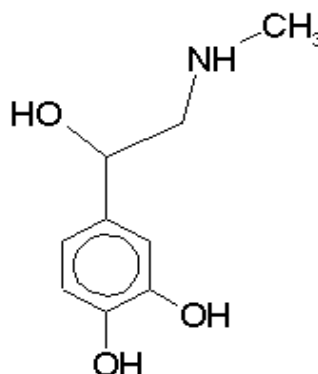


Figura 1- Estrutura da adrenalina

É pouco solúvel em água e em álcool, insolúvel em éter e clorofórmio. Solúvel em ácidos minerais e hidróxidos alcalinos. Deve ser guardada em recipientes herméticos e opacos. Preferentemente em recipientes nos quais o ar tenha sido substituído por nitrogênio. Deve conter no mínimo 97,0% e no máximo, 100,5% de $C_9H_{13}NO_3$, calculado em relação à substância seca.³⁻⁵

A adrenalina se enquadra na categoria dos simpatomiméticos. Atua na musculatura cardíaca e no metabolismo, é um vasoconstritor e hipertensor simpatomimético sendo transportado pelo sistema periférico e ajuda o corpo a enfrentar o estresse crônico. Mas a grande ou pequena concentração pode causar hipertensão, doença degenerativa cardíaca, esquizofrenia e psicose maníaca-depressiva.⁵

1.3 Métodos para Determinação de Adrenalina

Existem vários métodos para a determinação de adrenalina em produtos farmacêuticos relatados na literatura.⁶⁻⁹

Leite *et al.*⁶ desenvolveram um biossensor de pasta de carbono modificado com extrato de fungo como fonte da enzima lacase para determinação de catecolaminas. Esta enzima catalisa a oxidação de adrenalina ou dopamina para o-quinona e a corrente obtida na redução eletroquímica do produto formado relaciona a concentração dessas catecolaminas em solução. Este biossensor apresentou linearidade de $6,0 \times 10^{-5}$ a $7,0 \times 10^{-4}$ mol.L⁻¹ e limite de detecção de $7,9 \times 10^{-6}$ mol.L⁻¹.⁷

O método volumétrico é usado pela Farmacopéia Brasileira, Inglesa e Mexicana para a determinação de adrenalina em produtos farmacêuticos. Nesse método esta solução é preparada sob aquecimento em ácido acético glacial. O ácido perclórico 0,1 mol.L⁻¹ é usado como titulante e violeta cristal como indicador⁷⁻⁹.

Zaia *et al.*¹⁰ discutiram as vantagens e desvantagens de alguns métodos de determinação de proteínas propostas na literatura usando diferentes reagentes, entre eles, biureto, Lowry, "Coomassie brilliant blue" BG-250, Bradford, Smith ou BCA e absorção molecular na região ultravioleta¹⁰. Nessa discussão verifica-se que o método de biureto está sujeito à interferência de substâncias que possam reagir com o cobre(II). O método se baseia na reação do reativo de biureto, que é constituído de uma mistura de cobre(II), hidróxido de sódio e como complexante e estabilizante do Cu(II) em solução tartarato de sódio e potássio¹¹. O cobre, em meio alcalino, reage com as proteínas formando um complexo quadrado planar com a ligação peptídica. Apesar de ser rápido, utiliza reagentes de baixo custo e não apresenta grande variação da absorvidade específica para diferentes proteínas. Este método não é muito sensível, como foi destacado por diversos autores¹²⁻¹⁴, colocando-o em grande desvantagem, em relação a outras metodologias, e por isto tem sido, ao longo dos anos, substituído por métodos mais sensíveis. Mesmo assim, o método de biureto continua sendo recomendado para a determinação da

concentração de proteínas totais em plasma sangüíneo pela Associação Americana de Análises Clínicas e por diversos pesquisadores¹⁵ bem como para a determinação de proteínas totais em saliva e leite, quando comparado com outros métodos¹⁰.

2. OBJETIVOS

Determinar adrenalina em produtos farmacêuticos utilizando o reagente biureto a partir de medidas espectrofotométricas.

2.1 Objetivos Específicos

- Determinar a melhor concentração de Cu(II) na reação analítica com adrenalina;
- Estudar o tempo de reação da adrenalina e o reagente biureto;
- Determinar adrenalina em produto farmacêutico;
- Desenvolver uma nova metodologia analítica para determinar adrenalina em produtos farmacêuticos.

3. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

3.1 Equipamento

As medidas de absorvância foram realizadas empregando-se um espectrofotômetro HITACHI modelo U3000 utilizando uma cubeta de quartzo de 1,0 cm de caminho óptico.

3.2 Reagentes e Soluções

O reagente de biureto foi preparado pela dissolução de 2,945g de sulfato de cobre pentahidratado (Cinética Química Ltda) e 1,5 g de tartarato de sódio e potássio (Dinâmica) em 80 mL de água destilada. Adicionou-se com agitação constante 75mL de solução de hidróxido de sódio 10% (m/V). Transferiu este volume para um balão volumétrico de 250mL e completou-se o volume com água destilada.

As soluções padrão de adrenalina foram preparadas nas concentrações utilizadas, com a dissolução da massa necessária em 10mL de reagente biureto.

As ampolas de adrenalina foram adquiridas pelo Hospital Universitário da Universidade Federal de Santa Catarina.

3.3 Procedimento Analítico

Inicialmente, o espectro do reagente biureto, adrenalina e biureto+adrenalina foram obtidos, a fim de selecionar o comprimento de onda de trabalho. Em seguida, foram testadas diversas concentrações de Cu(II) na reação, a partir do máximo de absorção e estabilidade da reação.

Após seleção do comprimento de onda e concentração de Cu(II), estudou-se o tempo necessário para a formação do complexo de adrenalina e reagente biureto.

A partir da seleção das melhores condições da reação formada, foi construída a curva analítica da adrenalina a partir das soluções padrão de 0,1 a 0,7 mg.mL⁻¹ na presença do reagente biureto.

Foram feitas determinações em três amostras de ampolas de adrenalina. Uma alíquota de 1,0 mL dessa amostra foi transferida para um balão volumétrico de 5,0 mL, adicionado 3,0 mL do reagente biureto e completou-se o volume com água destilada. Este procedimento foi realizado em triplicata para todas as amostras e a leitura de absorbância foi feita em comprimento de onda igual a 665 nm.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Vários parâmetros foram investigados para otimização e obtenção de uma melhor resposta espectrofotométrica para determinação de adrenalina em produtos farmacêuticos utilizando a metodologia proposta.

4.1 Reagente de Biureto

O reagente de biureto é amplamente utilizado para a determinação de proteínas totais em diversos analitos, entre eles: soro ou plasma sanguíneo, líquido cérebro espinhal, urina, alimentos, saliva. O preparo é rápido, os reagentes utilizados são de baixo custo e não apresenta grande variação de absorvidade específica¹⁰. Essa reação acontece devido às ligações peptídicas, que ocorre para proteínas e peptídeos com três ou mais resíduos de aminoácidos e também as substâncias que contém dois grupos carbamínicos ($-\text{CO}-\text{NH}_2$) ligados diretamente ou por meio de um único átomo de carbono ou nitrogênio, que fornece uma reação positiva, de onde provém o nome do mesmo¹¹.

Assim, quando a solução de adrenalina é adicionada em solução de sulfato de cobre em meio alcalino, ocorre a formação de um complexo pela ligação de um íon Cu^{2+} com os nitrogênios peptídicos como mostra a Figura 2.

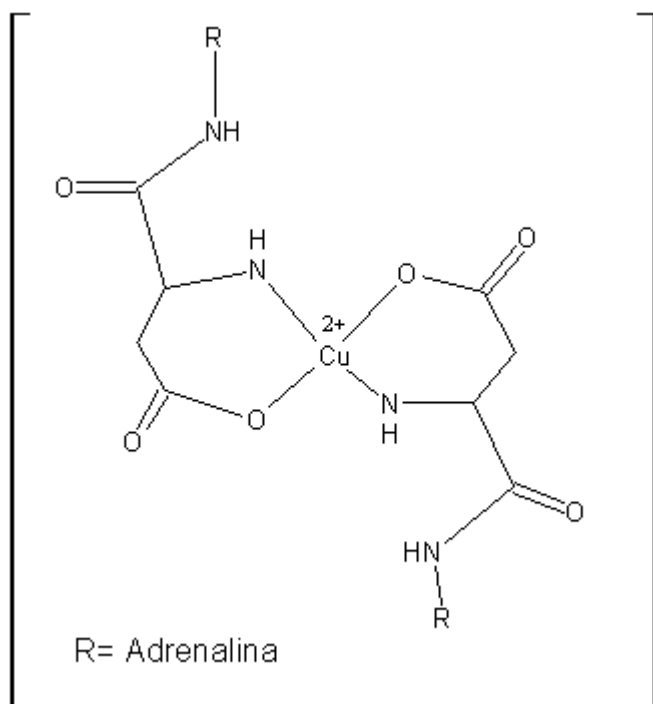


Figura 2. Complexo formado na reação da adrenalina com o reagente de biureto.

4.2 Espectro de Absorção Molecular

A adrenalina em meio aquoso absorve em comprimento de onda igual a 414 nm e o reagente biureto em 540 nm. A Figura 3 mostra o espectro de absorção molecular obtido na reação da adrenalina $4,35 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ e o reagente de biureto. Para o desenvolvimento desta metodologia analítica, acompanhou-se a formação do complexo em comprimento de onda igual a 665 nm.

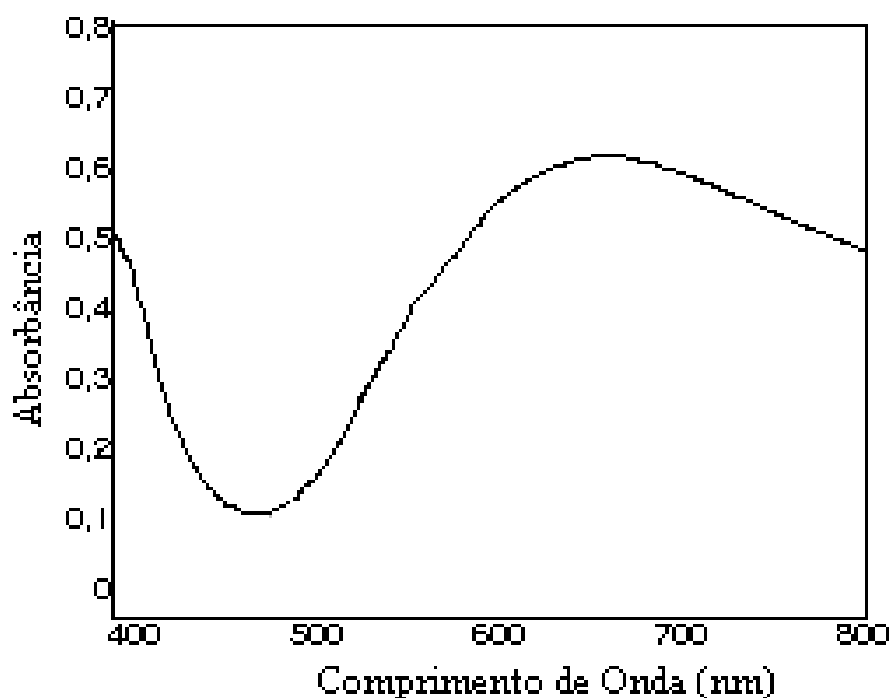


Figura 3. Espectro de absorção molecular do complexo formado na reação de adrenalina com o reagente biureto.

4.3 Estudo da Concentração de Cu(II)

Investigou-se o efeito da concentração de Cu(II) na presença de tartarato de sódio e potássio e solução de adrenalina $4,35 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em meio aquoso sobre a resposta espectrofotométrica. Como pode ser observado na Tabela 1, à medida que a concentração de Cu(II) aumenta, há um aumento do valor da absorbância.

Tabela 1. Estudo da concentração de Cu(II) a $\lambda = 665 \text{ nm}$.

[Cu²⁺] mol L⁻¹	Absorbância
0,006	0,095
0,012	0,17
0,0598	0,805
0,0838	1,115
0,0957	1,3
0,1077	1,455

A fim de verificar a relação linear entre a absorbância medida e a concentração de Cu(II) a curva analítica foi construída como mostra a Figura 4. Como pode ser observada a mesma possui uma relação linear entre a absorbância do complexo formado e as concentrações de Cu(II) no intervalo de concentração de 0,006 a 0,1077 mol L⁻¹ com um valor de $r = 0,9999$. Escolheu-se, para o desenvolvimento deste trabalho, a concentração de 0,0472 mol.L⁻¹, pois soluções com concentrações maiores apresentaram precipitados em um período de repouso de 24 horas.

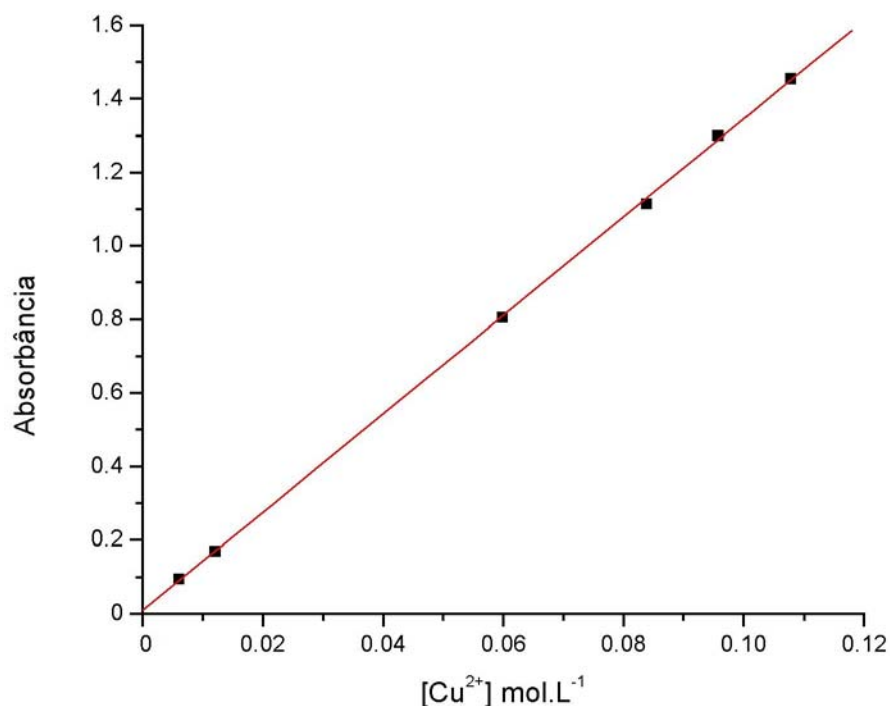


Figura 4. Curva analítica obtida para diferentes concentrações de Cu(II) e adrenalina $4,35 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$

4.4 Estudo do Tempo de Reação

Após a seleção do comprimento de onda de 665 nm e estudo da concentração de Cu(II), estudou-se o tempo de reação de 0 a 120 minutos sobre a resposta analítica para soluções de adrenalina de 0,2 a 0,8 mg.mL⁻¹ e o reagente de biureto.

Como pode ser observado na Figura 5, a absorbância, mantém-se constante durante o tempo investigado para concentrações de até 0,4 mg.mL⁻¹. Para desenvolvimento desta metodologia foi empregado o tempo de 5 minutos para obtenção das medidas de absorbância do complexo formado na reação.

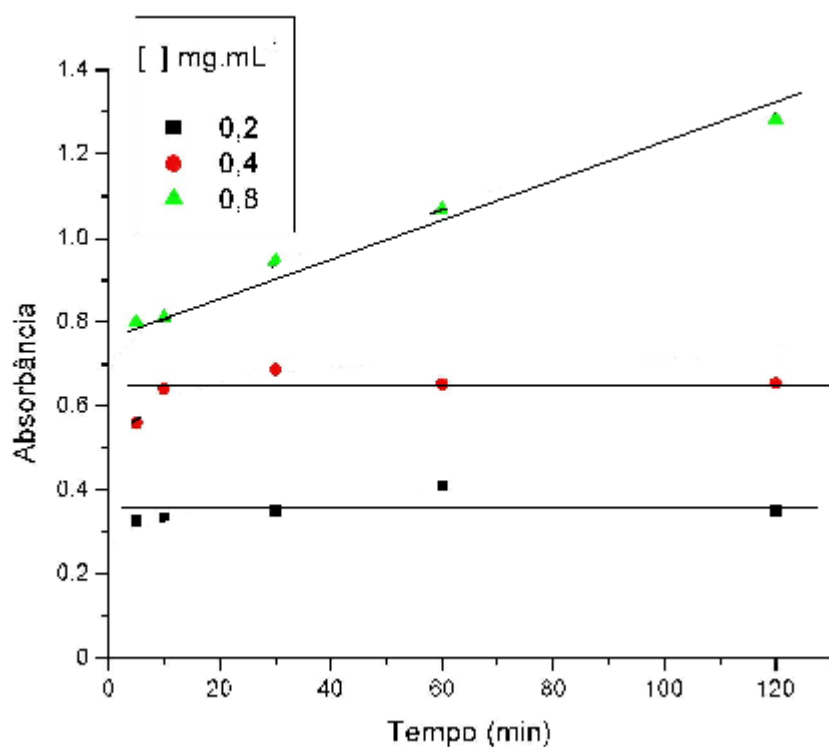


Figura 5. Estudo do tempo de reação usando diferentes concentrações de adrenalina e biureto, no tempo de 0 a 120 minutos.

4.5 Curva Analítica de Adrenalina

A Figura 6 mostra a curva analítica obtida com soluções padrão de adrenalina usando o reagente de biureto. O método proposto possui relação linear entre a absorbância medida e a concentração de adrenalina no intervalo de concentração de 0,1 a 0,7 mg.mL⁻¹ ($Abs = 0,103 + 1,04 [Adrenalina]$; $r = 0,9999$).

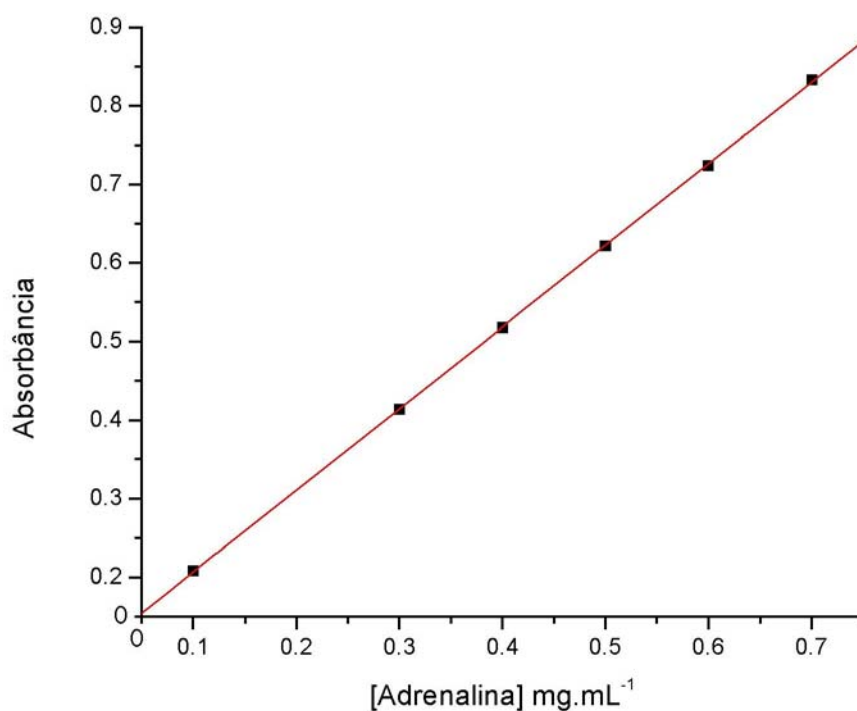


Figura 6. Curva analítica da adrenalina construída no tempo de reação de 5 min.

4.6.Determinação Espectrofotométrica de Adrenalina em Produto Farmacêutico

A adrenalina é comumente empregada como broncodilatador, agente antiarrítmico e descongestionante nasal. Usada como base livre ou como cloridrato, borato ou tartarato é utilizado em injeções subcutâneo por ser inativa por via oral. Este fármaco é normalmente encontrado em solução aquosa em uma concentração de 1,0 mg.mL⁻¹.

Para avaliar o desempenho do método espectrofotométrico proposto, determinou-se adrenalina em ampolas. Os valores da Tabela 2 apresentam os

resultados obtidos de adrenalina (mg.mL^{-1}) em formulação farmacêuticas e os valores rotulados.

Tabela 2. Determinação de adrenalina em formulação farmacêutico utilizando o método espectrofotométrico proposto e comparando com o valor rotulado.

Amostra	Adrenalina (mg.mL^{-1})		Erro relativo (%)
	Valor rotulado	Valor obtido	
A	1,0	0,9963	0,37
B	1,0	0,9975	0,25
C	1,0	0,9954	0,46

5. CONCLUSÕES

Muitos fatores são importantes, a sensibilidade necessária nos equipamentos, que é dependente da concentração na amostra e do volume de amostra disponível; a rapidez do processo e o custo da metodologia, e não menos importante o grau de confiabilidade nos resultados obtidos. Mas os resultados obtidos são satisfatórios podendo assim concluir que é um método confiável, rápido e de baixo custo.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. SENISE, P. **Química Analítica E Análise Química**. Conferência proferida em 6 de setembro de 1989, durante o V Encontro Nacional de Química Analítica, ENQA, Salvador, BA.
2. BARREIRO, E. J.; **A Química da Vida e os Fármacos**; 26ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química;
3. KOROLKOVAS, A.; **Química Farmacêutica**. Ed Guanabara Koogan. Rio de Janeiro, 1988.
4. **The Merck Index**; p. 613; Merck & Co ind;
5. Adrenaline Elise, Enzyme Immunoassay for the Quantitative Determination of Adrenaline in Plasma and Urine, **Biosource**, Catalogue n.: KAPL10-0100
Revision No : 030514;
6. LEITE, O. D.; FATIBELLO-FILHO, O.; BARBOSAB, A. M.; Determination of Catecholamines in Pharmaceutical Formulations Using a Biosensor, **J. Braz. Chem. Soc.**, v. 14, n. 2, p. 297, 2003.
7. **FARMACOPÉIA BRASILEIRA**, 3ª Edição, Andrei Editora S.A., 1977;
8. **BRITISH PHARMACOPOEIA** 1993, v. I, p. 24; United Kingdom. HMSO;
9. **FARMACOPOEIA DE LOS ESTADOS UNIDOS MEXICANOS**; Secretaria de Salud; 5ª ed.; Mexico 1988;

10. ZAIA, D. A. M.; ZAIA, C. T. B. V.; LICHTIG, J., Determinação de Proteínas Totais Via Espectrofotometria: Vantagens e Desvantagens dos Métodos Existentes, **Química Nova**, v. 21, n. 6 (1998);
11. GORNALL, A. G.; BARDAWILL, C. J.; DAVID, M. M.; **J. Biol. Chem** ., n. 177, p. 751, 1949;
12. HISCHE, E. A. H.; van der HELM, H. J.; van MEEGEN, M. Th.; BLANKEN, H. I. G.; **Clin.Chem** ., n. 28, p. 1236, 1982;
13. MACART, M.; GERBAUT, L.; **Clin. Chim. Acta**, n.141 , p.77,1984;
14. JENZANO, J. W.; HOGAN, S. L.; NOYES, C. M.; FEATHERSTONE, G. L.; LUNDBLAD, R. L.; **Anal. Biochem.**, n. 159, p. 370, 1986;
15. HUNN, J. B.; GREER, I. E.; **J. Fish Biol.**, n. 36, p. 617,1990.